

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

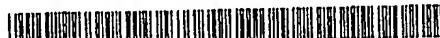
- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/77384 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/68, (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, G01N 33/50 AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/IB01/00713

(22) Internationales Anmeldedatum:
6. April 2001 (06.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 19 173.8 7. April 2000 (07.04.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexander [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE). PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwartzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE). BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Clemens; Joachimstrasse 9, 10119 Berlin (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM; KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

A2

(54) Title: DETECTION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNP'S) AND CYTOSINE-METHYLATIONS

1/77384

(54) Bezeichnung: DETEKTION VON SNPs UND CYTOSIN-METHYLIERUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to a set of oligonucleotides or peptide nucleic acid (PNA) oligomers and to a method suited for detecting cytosine methylations and single nucleotide polymorphisms (SNP's) in genomic DNA samples. Said method is used for diagnosing and/or prognosis detrimental occurrences for patients or individuals such as medical disorders.

WO

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren und ein Verfahren, das sich zur Detektion von Cytosin-Methylierungen und SNPs in genetischen DNA-Proben eignet. Dieses Verfahren dient der Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wie Erkrankungen.

Detektion von SNPs und Cytosin-Methylierungen

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen repräsentativen Satz von Oligonukleotiden oder PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren, welche sich zum gleichzeitigen Detektieren von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) und Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben zur Unterscheidung von Zelltypen besonders eignet, sowie ein verwendetes Verfahren.

Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insoweit äußern sich pathogene Zustände in einem veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

Stand der Technik

Das Humangenomprojekt, die Erstsequenzierung des menschlichen Genoms, wird in den nächsten Jahren abgeschlossen werden. Durch dieses Projekt wird es möglich werden, alle etwa 100.000 Gene zu identifizieren. Die Sequenzinformation öffnet ungeahnte Möglichkeiten für die Aufklärung der Genfunktionen. Dies wiederum eröffnet die Möglichkeit Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zu betreiben. Die Pharmakogenetik und Pharmakogenomik zielt auf den Einsatz von Medikamenten in Abhängigkeit eines Genotypen. Dadurch soll die Effektivität von Medikamenten gesteigert werden. Der notwendige Zwischenschritt ist die Bestimmung der Po-

lymorphismen und Genotypen, die mit einem bestimmten Ansprechen assoziiert sind. Verlangt werden deshalb immer effizientere Genotypisierungsmethoden.

5 Derzeit gibt es zwei Kategorien von polymorphen Markern, die zur Genotypisierung eingesetzt werden, Mikrosatelliten und Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs). Mikrosatelliten sind hoch polymorph, d.h. sie haben ein Vielzahl von Allelen. Sie sind dadurch charakterisiert, dass ein
10 repetitives Sequenzelement, mit einer unterschiedlichen Anzahl Wiederholungen für unterschiedliche Allele, von konservierten Sequenzen frankiert ist. Durchschnittlich gibt es einen Mikrosatellitenmarker pro 1 Million Basen. Eine Karte von 5.000 positionierten Mikrosatellitenmarkern wurde von CEPH publiziert. Mikrosatelliten werden
15 durch die Größenbestimmung von Produkten einer PCR mit Primern der konservierten, flankierenden Sequenz genotypisiert. Die Fluoreszenz markierten PCR Produkte werden auf Gelen aufgetrennt.
20 Es gibt vergleichsweise wenige beschriebene SNP Marker. Eine Karte mit 300.000 SNP Markern wird derzeit vom SNP Konsortium entwickelt und wird öffentlich zugänglich sein. Sind die SNP Marker identifiziert, können sie genetischen Positionen zugeordnet werden. Es ist angestrebt,
25 150.000 SNP Marker bis zum Jahr 2001 zu kartieren (Mashall, E. (1999); Science, 284, 406-407). Es gibt eine Handvoll Genotypisierungsmethoden für SNPs. Einige basieren auf der Auftrennung von Produkten auf Gelen, wie der oligonucleotide ligase assay (OLA). Er eignet sich daher eher für den mittleren Durchsatz. Andere vertrauen auf reine Hybridisierung, die jedoch nicht die gleiche Stringenz hat. DNA Arrays (DNA-chip) eignen sich für die Analyse einer großen Anzahl SNPs in einer beschränkten Anzahl von Individuen. Bis jetzt sind Beispiele gezeigt worden, in denen 1.500 SNPs auf einem DNA Chip genotypi-
30
35

siert wurden. Die wirkliche Stärke von DNA Chips liegt in Ansätzen, wie der Resequenzierung und der Expressionsanalyse. Ansätze welche Primerverlängerung anwenden sind gezeigt worden (Head, S. R. et al., (1999); Mol Cell Probes, 13(2), 81-87). Diese haben den Vorteil, wenn mit fluoreszenzmarkierten Terminatorbasen gearbeitet wird, dass die Resultate mit einem einfachen ELISA Lesegerät gesammelt werden können.

5

10 Es gibt einige SNP Genotypisierungsmethoden, die Massenspektrometrie zur Analyse verwenden. Diese haben den wesentlichen Vorteil, dass die allel spezifischen Produkte eine physische Darstellung der Produkte sind und nicht ein z. B. fluoreszierendes Signal, dass indirekt dem Produkt zugeordnet wird.

15

Die Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI) hat die Analytik von Biomolekülen revolutioniert (Karas, M. & Hillenkamp, F. Anal. Chem. 60, 2299-2301 (1988)). MALDI ist in verschiedenen Varianten zur Analyse von DNA eingesetzt worden. Die Varianten reichen von primer extension bis Sequenzierung (Liu, Y.-H., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 735-743 (1995); Ch'ang, L.-Y., et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9, 772-774 (1995); Little, D.P., et al. J. Mol. Med. 75, 745-750 (1997); Haff, L. & Smirnov, I.P. Genome Res. 7, 378-388 (1997), Fei, Z., Ono, T. & Smith, L.M. Nucleic Acids Res. 26, 2827-2828 (1998); Ross, P., Hall, L., Smirnov, I. & Haff, L. Nature Biotech. 16, 1347-1351 (1998); Ross, P.L., Lee, K. & Belgrader, P. Anal. Chem. 69, 4197-4202 (1997); Griffin, T.J., Tang, W. & Smith, L.M. Nature Biotech. 15, 1368-1372 (1997)). Der größte Nachteil all dieser Methoden ist, dass alle eine gründliche Aufreinigung der Produkte vor der MALDI Analyse benötigen. Spin column Aufreinigung oder der Einsatz von

20

25

30

35

magnetic bead technology oder reversed-phase Aufreinigung sind notwendig.

Die Analyse von DNA im MALDI ist stark abhängig vom Ladungszustand des Produktes. Eine 100-fache Verbesserung der Empfindlichkeit in der MALDI Analyse kann dadurch erreicht werden, dass der Ladungszustand auf dem zu analysierenden Produkt so kontrolliert wird, dass nur eine einzige positive oder negative Überschussladung vorhanden ist. So modifizierte Produkte sind auch wesentlich weniger anfällig auf die Ausbildung von Addukten (z.B. mit Na und K, Gut, I.G. and Beck, S. (1995) Nucleic Acids Res., 23, 1367-1373; Gut, I.G., Jeffery, W.A., Pappin, D.J.C. and Beck, S. Rapid Commun. Mass Spectrom., 11, 43-50 (1997)). Ein SNP Genotypisierungsverfahren, welches von diesen Bedingungen Gebrauch macht, mit dem Namen "GOOD Assay" wurde kürzlich vorgestellt (Sauer, S. et al., Nucleic Acids Research, Methods online, 2000, 28, e1 3).

Die am häufigsten in der DNA eukaryotischer Zellen kovalent modifizierte Base ist 5-Methylcytosin. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, beim genetischen Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfat mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer

Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch "normale" molekularbiologische Techniken als einzige verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode erschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255. Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnigk, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer

Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine "PrimerExtension-Reaktion" (Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-A 95/00669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P. W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO-A 99/28498).

10

Weitere Publikationen die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261 WO-A 97/46705 und WO-A 95/15373.

20

Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der dort zitierten Literatur entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszent markierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

35

Aufgabenstellung

Die vorliegende Erfindung soll einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren und ein Verfahren bereitstellen, welche sich zum gleichzeitigen Detektieren von SNPs (single nucleotide polymorphisms) und Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben besonders eignen.

10

Beschreibung

Die Aufgabe wird also durch einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA gelöst, wobei die Basensequenzen ausgewählt sind aus SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

20

Es ist ferner erfindungsgemäß, dass der erfindungsgemäße Satz sowohl die Basensequenzen mit der SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 selbst und/oder die durch Verlängerung, Verkürzung oder Veränderung der genannten Sequenzen mit der SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 enthält. Der erfindungsgemäße Satz kann sich erfindungsgemäß also aus unveränderten Sequenzen und/oder in erfindungsgemäßer Weise veränderten Sequenzen zusammensetzen.

30

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen Satz von Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) zur Detektion von Single Nucleotide Polymorphismen und/oder des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA, der besonders bevorzugt mindestens 10 der aufgeführten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-

35

ID: 382046 umfasst, oder aber mindestens 10 PNA-Oligomer oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die dort aufgelisteten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

5

In einer weiteren Variante des Verfahrens umfasst der Satz von Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) zur Detektion von Single Nucleotid Polymorphismen und/oder des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA mindestens 100 Oligonukleotid oder PNA Sequenzen, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber mindestens 100 PNA-Oligomere oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die dort aufgelisteten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

10

15

Besonders bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder C sein können.

20

25

30

Besonders bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA wiederum dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder G sein können.

35

Bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomicschen DNA dadurch gekennzeichnet, dass die Basense-

quenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder C sein können.

5 Bevorzugt ist der Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen A, T oder G sein können.

10 Der Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA ist besonders bevorzugt dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase weggelassen wird.

15 20 25 Der Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes in der chemisch vorbehandelten genomischen DNA ist vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers mindestens zwei Nukleobasen weggelassen werden.

30 Ein repräsentativer Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren, umfassend Oligomere und/oder Oligonukleotide gemäß den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, soll zur Detektion von Cytosin-Methylierungen und Einelnukleotidpolymorphismen in genomischer DNA zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung verwendet werden. Dazu werden die folgenden Verfahrensschritte nacheinander ausgeführt:

Im ersten Verfahrensschritt wird eine genomische DNA Probe derart chemisch behandelt, dass an der 5'-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base verwandelt werden.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-
Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Bevorzugt wird dazu die oben beschriebene Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse verwendet, die zu einer Umwandlung nicht methylierter Cytosin-Nukleobasen in Uracil führt.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durch, wobei eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet wird.

In einem zweiten Verfahrensschritt werden aus der chemisch vorbehandelten genomischen DNA mehr als zehn unterschiedliche Fragmente amplifiziert, die jeweils weniger als 2000 Basenpaare lang sind unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide als Primer.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden.

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens sind unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-

Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet.

Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium,
5 Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

Im dritten Verfahrensschritt hybridisiert man die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-
10 Oligomeren, die mindestens 10 der oben genannten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID:
382046.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens führt man
15 die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durch.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegen die Basensequenzen des erfindungsgemäßen Satzes von Oligonukleotiden, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID:
20 382046, mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vor, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

25 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegen die Basensequenzen des erfindungsgemäßen Satzes von Oligonukleotiden mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Base verlängert vor, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

30 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens liegen die Basensequenzen des erfindungsgemäßen Satzes von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen und des Cytosin-Methylierungszustandes mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei

weitere Basen verlängert vor, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird ein Satz von PNA-Oligomeren aus den oben genannten Basensequenzen verwendet, wobei jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase weggelassen wird.

In einer bevorzugten Variante des Verfahrens wird ein Satz von PNA-Oligomeren aus den oben genannten Basensequenzen verwendet, wobei jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers mindestens zwei Nukleobasen weggelassen werden.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen, nämlich ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes verwendet, oder aber mindestens 10 PNA-Oligomer oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die oben genannten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens werden mindestens 100 der oben genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen, nämlich ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes verwendet, oder aber mindestens 100 PNA-Oligomer oder Oligonukleotidsequenzen, die wiederum die oben genannten Sequenzen umfassen, nämlich die Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens ist mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden.

In einer erneut bevorzugten Variante des Verfahrens sind unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet.

5 Die Festphasenoberfläche besteht bevorzugt aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold.

10 Im letzten Schritt des Verfahrens detektiert man die hybridisierten Amplifikate. Die an den Amplifikaten angebrachten Markierungen sind an jeder Position der Festphase identifizierbar, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet.

15 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen.

20 In einer bevorzugten Variante des Verfahrens sind die Markierungen der Amplifikate Radionuklide.

25 In einer weiteren bevorzugten Variante des Verfahrens tragen die Amplifikate ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

30 In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens werden die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen.

35 In einer erneut bevorzugten Variante des Verfahrens weisen die erzeugten Fragmente im Massenspektrometer zur besseren Detektierbarkeit eine einzelne positive oder negative Nettoladung auf.

Der erfindungsgemäße Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren dient bevorzugt zur Diagnose und/oder

Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen. Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen verwendet, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; aggressive Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnverletzungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvalleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Vorzugsweise wird der erfindungsgemäße Satz von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung verwendet.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Kit, das mindestens 10 Oligonukleotide oder PNA-Oligomere und Primer zur Herstellung der Amplifikate sowie eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens enthält.

Erfnungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

10 Erfnungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

15 Erfnungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

20 Erfnungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

25 Erfnungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

30 Erfnungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.

35

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo jeweils am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase wegge lassen wird.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, wo jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oligomers mindestens zwei Nukleobasen wegge lassen werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 100 der oben nachstehend genannten Oligonukleotid oder PNA Sequenzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Verfahren zur Analyse eines repräsentativen Satzes von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben zur Unterscheidung von Zelltypen.

Im ersten Schritt des Verfahrens wandelt man in einer genomischen DNA Probe durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymidin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um.

Im zweiten Schritt des Verfahrens amplifiziert man aus dieser chemisch behandelten genomischen DNA mehr als zehn unterschiedliche Fragmente, die jeweils weniger als 2000 Basenpaare lang sind unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide als Primer.

Im dritten Schritt des Verfahrens hybridisiert man die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren, umfassend mindestens 10 der oben genannten Sequenzen ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046 oder aber Sequenzen, welche in der oben beschriebenen Weise verlängert, verkürzt oder verändert wurden.

Im vierten Verfahrensschritt entfernt man die nicht hybridisierten Amplifikate.

Im letzten Verfahrensschritt detektiert man die hybridisierten Amplifikate.

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt.

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden sind.

5 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

10 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.

15 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.

20 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.

30 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikate ablösbare Massenmarkierungen tragen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

35 Erfindungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.

5

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.

10

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen sind.

15

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchfuht wird.

20

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

25

Erfnungsgemäß bevorzugt ist es, dass die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.

30

Gegenstand der Erfindung ist zudem die Verwendung eines Satzes von mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen.

35

Erfindungsgemäß bevorzugt ist die Verwendung eines Satzes von mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen', Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Kränkheit; aggressive Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnverletzungen, psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes, Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist zudem die Verwendung eines Satzes von mindestens 10 der oben genannten Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genannten Sequenzen umfassen, zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist zudem ein Kit,
enthaltend mindestens 10 der oben genannten Oligonukleo-
tide und/oder PNA-Oligomere, ausgewählt aus den Sequenzen
SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046, oder aber von mindestens 10
5 Oligomeren oder Oligonukleotiden, welche die oben genann-
ten Sequenzen umfassen, und Primer zur Herstellung der
Amplifikate sowie eine Anleitung zur Durchführung des er-
findungsgemäßen Verfahrens.

10 Das Sequenzprotokoll mit den Sequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-
ID: 382046 liegt der Internationalen Anmeldung in elekt-
ronisch lesbarer Form bei und ist Bestandteil dieser An-
meldung.

15

Patentansprüche

1. Satz von Oligonukleotiden oder PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, ausgewählt aus den Basensequenzen SEQ-ID: 1 bis SEQ-ID: 382046.
2. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.
3. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um eine weitere Base verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.
4. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert

vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder C sein können.

5. Satz von Oligonukleotiden zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Basensequenzen mehrheitlich am 5'-Ende und/oder am 3'-Ende jeweils um mindestens zwei weitere Basen verlängert vorliegen, wobei die Basen entweder A, T oder G sein können.
10. Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oligomers eine Nukleobase weggelassen wird.
15. Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oli-
20. gomers mindestens zwei Nukleobasen weggelassen werden.
25. 7. Satz von PNA (Peptide Nucleic Acid) Oligomeren zur Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs, single nucleotide polymorphisms) und des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass jeweils am 5'- und/oder am 3'-Ende des Oligomers mindestens zwei Nukleobasen weggelassen werden.
30. 8. Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA, umfassend mindestens 10 der Oligonukleotid oder PNA Sequenzen der Ansprüche 1 bis 7.
- 35.

9. Satz von Oligomersonden (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere), zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen in chemisch vorbehandelter genomischer DNA, umfassend mindestens 100 der Oligonukleotid oder PNA Sequenzen der Ansprüche 1 bis 7.

10. Verfahren zur Analyse eines repräsentativen Satzes von Cytosin-Methylierungen und Single Nucleotide Polymorphismen in genomischen DNA-Proben zur Unterscheidung von Zelltypen, dadurch gekennzeichnet, dass man folgende Schritte ausführt:

15 a) in einer genomischen DNA Probe wandelt man durch chemische Behandlung an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymidin oder eine andere vom Hybridisierungsverhalten her dem Cytosin unähnliche Base um;

20 b) aus dieser chemisch behandelten genomischen DNA amplifiziert man mehr als zehn unterschiedliche Fragmente, die jeweils weniger als 2000 Basenpaare lang sind unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide als Primer;

25 c) man hybridisiert die Amplifikate an einen Satz von Oligonukleotiden oder PNA-Oligomeren, umfassend mindestens 10 Sequenzen der Ansprüche 1 bis 9;

30 d) man entfernt die nicht hybridisierten Amplifikate;

35 e) man detektiert die hybridisierten Amplifikate.

11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mittels einer Lösung eines Bisulfits, Hydrogensulfits oder Disulfits durchführt.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11 dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt wird.
- 10 13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12 dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonukleotide oder PNA-Oligomere an definierten Stellen an eine Festphase gebunden sind.
- 15 14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass unterschiedliche Oligonukleotid und/oder PNA-Oligomersequenzen auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.
- 20 15. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass an den Amplifikaten angebrachte Markierungen an jeder Position der Festphase, an der sich eine Oligonukleotidsequenz befindet, identifizierbar sind.
- 25 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass bei der Amplifikation mindestens ein Primer an eine Festphase gebunden ist.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass unterschiedliche Amplifikate auf der Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 5 19. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen der Amplifikate Radionuklide sind.
- 10 20. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate ablösbare Massenmarkierungen tragen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 15 21. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17 dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate, Fragmente der Amplifikate oder zu den Amplifikaten komplementäre Sonden im Massenspektrometer nachgewiesen werden.
- 20 22. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 21 dadurch gekennzeichnet, dass zur besseren Detektierbarkeit im Massenspektrometer die erzeugten Fragmente eine einzelne positive oder negative Nettoladung aufweisen.
- 25 23. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22 dadurch gekennzeichnet, dass man die Detektion mittels Matrix assistierter Laser Desorptions/Ionisations Massenspektrometrie (MALDI) oder mittels Elektrospray Massenspektrometrie (ESI) durchführt und visualisiert.
- 30 24. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, wobei die Polymerasen hitzebeständige DNA-Polymerasen sind.
- 35 25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von meh-

reinen DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wird.

Antwort auf die Anmerkung der Anmelder:

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 17 dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 26, wobei die genomische DNA aus einer DNA-Probe erhalten wurde, wobei Quellen für DNA z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon umfasst.
28. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren gemäss einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen.
29. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren gemäss Anspruch 28 zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; aggressive Symptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnverletzungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung,

Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

5

30. Verwendung eines Satzes von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

10

31. Kit, enthaltend mindestens 10 Oligonukleotide oder PNA-Oligomere gemäss Anspruch 1 und Primer zur Herstellung der Amplifikate sowie eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 10 bis 27.

15

Digitized by srujanika@gmail.com

卷之三

Das versteht man als nachhaltige Entwicklung, die den Menschen nicht nur mit Ressourcen versorgt, sondern auch die Ressourcen für zukünftige Generationen erhalten lässt. Das ist eine ganzheitliche Betrachtung, die nicht nur die ökologische Dimension berücksichtigt, sondern auch die soziale und die wirtschaftliche Dimension. Es geht darum, dass wir nicht nur die Ressourcen nutzen, sondern auch dafür sorgen, dass sie erhalten werden. Das ist eine ganzheitliche Betrachtung, die nicht nur die ökologische Dimension berücksichtigt, sondern auch die soziale und die wirtschaftliche Dimension. Es geht darum, dass wir nicht nur die Ressourcen nutzen, sondern auch dafür sorgen, dass sie erhalten werden.

and the author, however, "will not be bound by the results of his experiments."